

Received: 2009.10.19
Accepted: 2010.05.25
Published: 2010.06.09

Kwas całkowicie *trans*-retinowy (ATRA) w prewencji i terapii nowotworów*

All-trans retinoic acid (ATRA) in prevention and cancer therapy

Ewelina Hoffman, Wojciech P. Mielicki

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Kwas całkowicie *trans*-retinowy (ATRA) jest wykorzystywany w prewencji i terapii różnicującej niektórych typów nowotworów. Przynosi bardzo dobre rezultaty w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (APL). Odgrywa istotną rolę w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek zdrowych oraz zmienionych nowotworowo. W sposób pośredni lub bezpośredni reguluje ekspresję wielu genów, działając po związaniu z receptorami retinoidowymi (RARs) jako czynnik transkrypcyjny. W pracy przedstawiono przegląd aktualnego piśmiennictwa dotyczącego wpływu ATRA na wzrost i różnicowanie komórek, a także opisującego receptory RARs oraz ich rolę w komórkowym mechanizmie działania ATRA. Specjalną uwagę poświęcono wpływowi ATRA na proliferację i różnicowanie komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe:

kwas całkowicie *trans*-retinowy • receptory retinoidowe RARs • RXRs

Summary

Retinoids are useful pharmacological agents in therapy and prevention of cancer. All-trans retinoic acid (ATRA) is applied in chemoprevention and differentiation therapy of some cancers with particularly impressive results in the management of acute promyelocytic leukemia (APL). ATRA plays a major role in regulating growth and differentiation of a wide variety of normal and malignant cell types. ATRA mediates these effects by regulating gene transcription. Nuclear retinoic acid receptors (RARs) are considered to be the mediators of most of the effects of ATRA on gene expression. We present a current state of knowledge on the effects of ATRA on cell growth and differentiation as well as describe RARs and their role in the cellular mechanism of ATRA action. A particular attention was paid to the effects of ATRA on proliferation and differentiation of cancer cells.

Key words:

all-trans retinoic acid • retinoic acid receptors RARs • RXRs

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=911863>

Word count:

3118

Tables:

–

Figures:

4

References:

54

Adres autorki:

mgr Ewelina Hoffman, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź;
e-mail: ewelina.hoffman@gmail.com

* Praca finansowana z tematu 502-13-623.

WSTĘP

Kwas całkowicie *trans*-retinowy (all-*trans* retinoic acid, ATRA) (ryc. 1) należy do grupy retinoidów, pochodnych witaminy A (ryc. 2). Związki te mają charakter hydrofobowy, podobnie jak steroidy (hormony gonad, kory nadnerczy, witamina D) czy tyroidy (hormony tarczycy). Mają one istotne znaczenie fizjologiczne. Biorą udział w procesach widzenia, a także odgrywają ważną rolę w regulacji wzrostu i procesu różnicowania. Kwas całkowicie *trans*-retinowy i *cis*-retinowy regulują wzrost, rozwój i różnicowanie tkanek [20,37].

W warunkach fizjologicznych niedobór witaminy A, tak jak i jej nadmiar stają się szkodliwe dla organizmu. Niedobór witaminy A to najważniejsza przyczyna ślepoty. Długotrwały niedobór retinoidów jest przyczyną suchości spojówek, prowadzącej do keratynizacji rogówki i ślepoty. Witamina A odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek układu immunologicznego, nawet łagodne jej niedobory są przyczyną zwiększonej podatności na infekcje. Jednak nadmiar witaminy A w organizmie staje się toksyczny, gdyż ustrój wykazuje tylko ograniczoną możliwość jej metabolizowania [20,37].

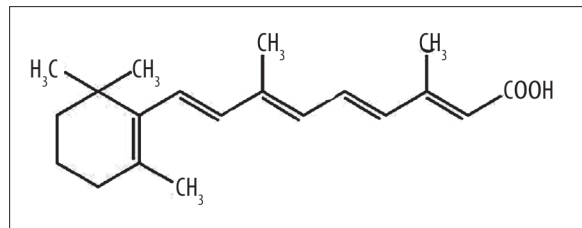
Wyniki różnych eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach lub hodowlach komórkowych *in vitro*, a także badań klinicznych dowodzą, że kwas retinowy i jego syntetyczne pochodne mogą być wykorzystywane jako środki farmakologiczne w prewencji i terapii nowotworów. Fenretinid, półsyntetyczna pochodna kwasu retinowego, okazał się czynnikiem chemoprotekcyjnym [36]. Natomiast arotinoidy są grupą poliaromatycznych retinoidów III generacji pozbawionych działań niepożądanych charakterystycznych dla naturalnego kwasu retinowego [36]. Zarówno retinoidy naturalne, jak i ich syntetyczne pochodne, działają przeciwnowotworowo wpływając na proliferację i różnicowanie komórek nowotworowych, a także uruchamiają mechanizmy apoptozy, co ma podstawowe znaczenie w ograniczaniu rozwoju nowotworu [37,39].

Komórki nowotworowe charakteryzują się upośledzeniem mechanizmu kierującego je na szlak apoptozy, natomiast ich niekontrolowane podziały powodują powstawanie guzów. Zróżnicowanie komórek rakowych umożliwia wprowadzenie ich na drogę programowanej śmierci, a więc jest jedną ze strategii terapii przeciwnowotworowej [20]. Retinoidy, w tym ATRA, wywołują apoptozę działając poprzez wiązanie się z receptorami RARs lub niezależnie od receptorów RARs [36]. Dlatego też kwas całkowicie *trans*-retinowy oraz jego receptory znajdują się w centrum zainteresowania coraz większej liczby zespołów badawczych, a badania nad ich komórkowym mechanizmem działania mogą przynieść praktyczne korzyści w terapii choroby nowotworowej [39,45].

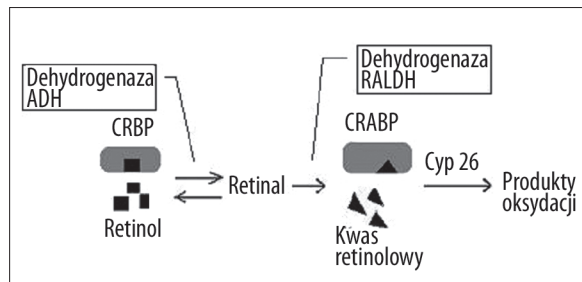
RECEPTORY RETINOIDÓW

Retinoidy działają na komórkę poprzez receptory jądrowe. Kwas retinowy wiąże się z receptorem jądrowym w tzw. sekwencji odpowiedzi hormonalnej, gdzie reguluje transkrypcję swoistych genów [54].

Jądrowe receptory retinoidów dzielą się na dwie rodziny.



Ryc. 1. Kwas całkowicie *trans*-retinowy (ATRA)



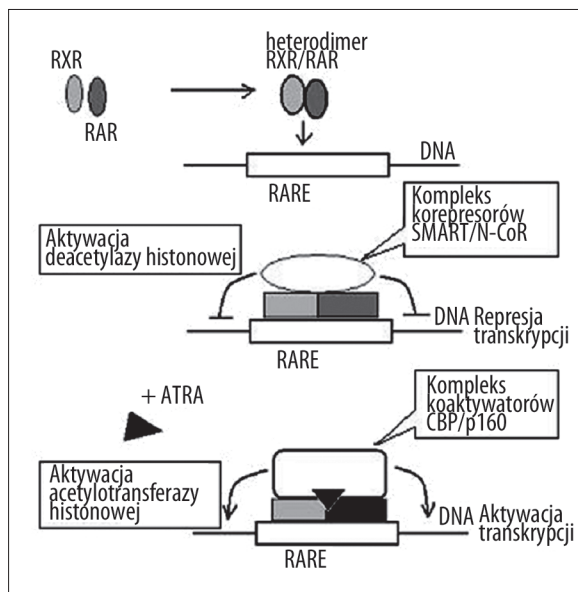
Ryc. 2. Przemiany wewnątrzpochodnego kwasu retinowego (witaminy A). Jest on syntetyzowany poprzez oksydację retinalu z udziałem dehydrogenazy RALDH. Retinal powstaje z retinolu z udziałem dehydrogenazy ADH lub krótkołańcuchowej dehydrogenazy/reduktazy RDH/SDR. Białka CRBP mogą wiązać retinol, podczas gdy białka CRABP wiążą kwas retinowy. Wewnątrzkomórkowy kwas retinowy jest metabolizowany z udziałem CYP26

1. **Receptory kwasu retinowego** (RARs – retinoic acid receptors). Rozpoznają jako ligand kwas całkowicie *trans*-retinowy oraz kwas 9-*cis* retinowy i kwas 13-*cis* retinowy.
2. **Receptory retinoidowe X** (RXRs – retinoic X receptors). Rozpoznają jako ligand kwas 9-*cis*-retinowy.

Każda z rodzin obejmuje 3 izotypy receptorów (α , β i γ), kodowane przez różne geny [21,22,41,47,54].

Receptory retinoidowe obu rodzin wiążąc ligand ulegają dimeryzacji i tworzą hetero- lub homodimery pełniące funkcje czynników transkrypcyjnych. Rodzaj dimeryzacji decyduje o charakterze oddziaływań z DNA. Receptor RAR tworzy wyłącznie dimery z receptorem RXR i w postaci takiego heterodimeru oddziałuje z elementami odpowiedzi na retinoidy w DNA. Receptor RXR ulega hetero- lub homodimeryzacji. Partnerami RXR w heterodimerach są receptory RAR, receptory hormonów tarczycy, a także witaminy D oraz receptory czynnika proliferacji peroksysonów [1,20,39,41,54].

Heterodimery dają możliwość krzyżowych oddziaływań między ścieżkami sygnałowymi hormonów jądrowych. Dimeryczne postacie receptorów retinoidów (RAR/RXR lub RXR/RXR) są umiejscowione w jądrze komórkowym i nawet bez obecności liganda wiążą się ze swoistymi sekwencjami regulatorowymi w regionach promotorowych genów (zawierających tzw. retinoid hormone response element – RARE), których ekspresja modulowana jest przez retinoidy. Pozbawione ligandów heterodimery wiążą się z DNA w obrębie sekwencji RARE, jednocześnie wiążąc się z korepresorem (N-CoR lub SMRT), co aktywuje deacetylazę histonową. Takie działanie wycisza



Ryc. 3. Mechanizm regulacji zespołu genów przez heterodimery RAR/RXR. Rozpoznają one odpowiednie regiony genów związanych z odpowiedzią na retinoidy – RARE. W razie nieobecności liganda (ATRA), heterodimery RAR/RXR wiążą się z nicią DNA w towarzystwie korepresora i tłumią transkrypcję. Natomiast w przypadku oddziaływania liganda (ATRA), zmiana konformacji pozwala na dysocjację korepresora i przyłączenie koaktywatora, tym samym prowadząc do aktywacji transkrypcji zespołu genów

ekspresję genów przez kondensację chromatyny (reprezja) [1,3,41]. Natomiast wiązanie z ligandem (ATRA) powoduje zmiany konformacyjne, uwolnienie korepresorów, aktywację acetylotransferazy histonowej i koaktywatorów (CBP, p160). Połączenie z koaktywatorem prowadzi do acetylacji histonów, decondensacji chromatyny i aktywacji transkrypcji. W ostatnim etapie działa kompleks czynników, pod wpływem których zwiększa się częstość inicjacji transkrypcji. W skład kompleksu wchodzi m.in. polimeraza II RNA, kompleks mediatora, białko wiążące kompleks TATA oraz czynniki związane z tym białkiem [1,3,54] (ryc. 3).

Retinoidy są metabolizowane przez enzymy z rodziny CYP26. ATRA jest silnym ligandem dla CYP26A1. Głównym produktem CYP26A1 jest 4-hydroksy kwas retinowy, który następnie zostaje przekształcany do postaci bardziej polarnej i usunięty z organizmu [26,32].

ATRA A NOWOTWORY

Kwas całkowicie *trans*-retinowy hamuje proliferację i nasila różnicowanie komórek nowotworowych indukując ich apoptozę. Działanie to udowodniono w przypadku ostrej białaczki promielocytowej, ale wiele badań dowodzi podobnego działania ATRA na nowotwory, takie jak: czerniak, rak głowy i szyi, piersi, płuc, prostaty, nowotwory przewodu pokarmowego [39]. ATRA powoduje zahamowanie wzrostu komórek tych nowotworów, zazwyczaj niezwiązane ze śmiercią komórki, ale z zatrzymaniem jej cyklu w fazie G1. ATRA obniża syntezę DNA, indukuje zmiany morfologiczne oraz wydłuża czas podwajania

liczby komórek [39]. Przebadano wiele linii komórkowych porównując ekspresję RARs w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo. Wykazano, że ekspresja RARβ jest bardzo mała w komórkach nowotworów piersi, głowy i szyi, płuc, jajników [34,38].

Czerniak

Komórki czerniaka inkubowane z ATRA wykazywały dysfunkcje mitochondriów, zaburzenia cyklu komórkowego, zahamowanie różnicowania, a to kierowało je na szlak apoptozy [49]. Efekt cytotoksyczny ATRA jest zależny od dawki oraz czasu ekspozycji. ATRA już w niewielkim stężeniu powoduje spadek aktywności mitochondriów. Działanie to jest silniejsze w komórkach nowotworów pierwotnych, co prawdopodobnie wiąże się z większą wrażliwością obecnych w nich mitochondrialnych dehydrogenaz. Przypuszcza się, że dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c do cytosolu i uaktywnienia kaspaz [49]. Przeprowadzono także badania mające na celu zbadanie poziomu ekspresji białka p53 oraz rodziny białek Bcl-2. Po ekspozycji na ATRA dochodzi do modyfikacji profilu ekspresji tych białek. Ekspresja p53, p21 i Bax ulega zwiększeniu, natomiast ekspresja białka Bcl-2 zmniejsza się. Zmiany te są zależne od dawki oraz czasu ekspozycji [48].

Rak głowy i szyi

Retinoidy hamują rozwój i zmniejszają liczbę przypadków zmian nowotworowych w obrębie głowy i szyi [31,52]. W początkowych zmianach chorobowych obserwowano wybiórczy zanik ekspresji RARβ, co może promować dalszy rozwój raka [25,39]. Oprócz obniżonej ekspresji RARβ, w komórkach nowotworowych zaobserwowano także dużą aktywność kreatyny K1 i T-glutaminazy I, białek, które są markerami różnicowania i keratynizacji komórek. ATRA obniża stężenie obydwu tych białek [51, 53].

Rak piersi

Proapoptotyczne działanie ATRA jest związane z aktywacją N-terminalnej kinazy Jun (JNK) [40]. Mechanizm apoptozy wywołanej przez JNK nie jest do końca wyjaśniony [40]. Inne badania przeprowadzone na komórkach nowotworowych raka piersi wykazują, że istotne dla apoptozy jest formowanie w jądrze heterodimerów TR3/RARα i ich translokacja do cytoplazmy, oraz zmiany w ekspresji białek Bcl-2 i Bax [46]. W większości komórek nowotworowych raka piersi ekspresja genu RARβ jest obniżona lub całkowicie wyciszona [34,45].

Zaobserwowano, że retinoidy wykazują dużą skuteczność w połączeniu z chemioterapią [35]. Długoterminowa terapia skojarzona, tzn. tamoksyfen, interferon β i kwas retinowy, charakteryzuje się dużą skutecznością przy umiarkowanych działaniach niepożądanych [35]. Badania wykazują, że u pacjentek z rakiem piersi leczonych wyłącznie tamoksyfenem, często rozwija się pełnoobjawowy zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrzkrążeniowego. W związku z tym ATRA wykazuje bardzo korzystne właściwości zarówno antynowotworowe, jak i hamujące koagulopatie, obniżając potencjał prokoagulacyjny osocza [13]. Efekt taki obserwuje się już przy niskich stężeniach ATRA [13].

Nowotwory przewodu pokarmowego

W przypadku nowotworów przewodu pokarmowego stwierdza się dużą ekspresję RAR α , co prowadzi do powstawania heterodimerów RAR α /RXR α i tym samym skutkuje zmianami w cyklu komórkowym [50]. Wiadomo, że RAR α jest głównym mediatorem działania ATRA. Aby ATRA hamował wzrost komórek nowotworowych niezbędny jest wysoki poziom ekspresji jego receptorów. Wykazano, że ATRA zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 [43,50]. To działanie jest związane z modulowaniem ekspresji niektórych białek. Uważa się, że zaktywowana zostaje ekspresja białka p21^{WAF1/CIP1}, które następnie wpływa na obniżenie poziomu białek CDK4 i CDK2, a to z kolei podnosi stężenie defosforylowanej postaci białka Rb [43]. Działanie jest zależne zarówno od dawki, jak i stężenia [50]. Ponadto ATRA obniża ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń, co w konsekwencji hamuje angiogenezę i rozrost guza [50]. Wykazano również, że przeciwnowotworowy wpływ ATRA na komórki raków przewodu pokarmowego jest związany z zahamowaniem aktywności mediatora AP-1 (activator protein 1) [44]. Cechą tkanek przewodu pokarmowego jest ich duże tempo proliferacji. Intensywnym procesom proliferacji i apoptozy ulegają ciągle złuszczone komórki przelyku, jelita. Procesy te muszą być dokładnie regulowane. Jednym z najważniejszych czynników regulacji proliferacji i apoptozy jest czynnik transkrypcyjny AP-1, który przez hamowanie aktywności białka p21 działa antyapoptotycznie [38]. ATRA działa poprzez RAR α i RAR β , które pośredniczą w inhibicji AP-1, przy czym RAR β wykazuje do pewnego stopnia także bezpośrednio działanie hamujące na AP-1 [44].

Rak trzustki

Rak trzustki jest chorobą o dużym wskaźniku umieralności i bardzo złych rokowaniach. Zazwyczaj łączy się z najgorszymi prognozami w porównaniu z nowotworami innych narządów. Dodatkowo niezbyt dobrze odpowiada na chemioterapię. Przedkliniczne badania z wykorzystaniem ATRA wykazują, że związek ten może mieć korzystne działanie w leczeniu pacjentów z rakiem trzustki [17]. Badano wpływ ATRA na przebieg cyklu komórkowego oraz aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP), która jest wskaźnikiem różnicowania komórek. Po ekspozycji na ATRA obserwowano zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz znaczny wzrost aktywności ALP w porównaniu z kontrolą [17]. Inne badania donoszą o zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1 lub G2 oraz wzroście aktywności kaspazy 3 [7,8,18]. Zaobserwowano także zwiększoną liczbę i aktywność mitochondriów [9]. Białko Chmp 1A (chromatin modyfing protein 1A/Charge multivesicular protein 1A) bierze udział w regulacji działania ATRA poprzez wpływ na białko CRBP-1 (cellular retinol-binding protein 1) [23]. Dwa wewnątrzkomórkowe nośniki wiążące kwas retinowy, CRABP-I i CRABP-II, transportują go do jądra oraz buforują jego poziom w komórce. Funkcją CRABP-II jest odizolowanie ATRA i wspomaganie jego metabolizmu przez enzym cytochromu P450 [23]. CRBP-1 jest głównym regulatorem ATRA przez wpływ na jego metabolizm i umiejscowienie w komórce. Wykazano, że białko Chmp 1A jest również zaangażowane w tę ścieżkę reakcji. ATRA znacząco aktywuje ekspresję białek Chmp 1A, CRBP-1 i p53, oraz wywołuje zahamowanie wzrostu

komórki. Ponadto istotne znaczenie odgrywa umiejscowienie białka Chmp 1A, gdyż w komórkach wrażliwych na ATRA znajduje się ono w jądrze, a w komórkach niewykazujących żadnej odpowiedzi ulega przeniesieniu do cytoplazmy komórki [23].

Rak jelita grubego

Retinoidy hamują wzrost komórek raka jelita grubego. Obniżają poziom ekspresji metaloproteinaz MMP-1 i -2 oraz aktywność metaloproteinaz MMP-2 i -9, jednocześnie podwyższając stężenie tkankowego inhibitora MMP-1. Redukują potencjał metastatyczny poprzez niezależne receptory RARs, które mogą obniżyć ekspresję i stężenie metaloproteinaz macierzowych MMP [33]. W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy regulują procesy rozwoju płodu, warunkują homeostazę organizmu, odgrywają istotną rolę w procesach gojenia, przebudowie tkanek i angiogenezie. Zaburzenia regulacji aktywności MMPs są obserwowane w wielu chorobach nowotworowych, w procesach miażdżycowych, owrzodzeniach, w zapaleniu stawów. Metaloproteinazy nasilają inwazję nowotworu przez ich zaangażowanie w procesy przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, we wzrost i migrację komórek oraz intensyfikację napływu czynników wzrostu i cytokin [42].

ATRA W LECZENIU OSTREJ BIAŁACZKI PROMIELOCYTOWEJ (APL)

Białaczki to choroby nowotworowe szpiku, które ujawniają się zmianami ilościowymi lub jakościowymi krwinek białych we krwi obwodowej. Nazwą ostrej białaczki określa się grupę chorób układu krwiotwórczego, w których dochodzi do proliferacji z jednoczesnym zahamowaniem dojrzewania krwinek białych we wczesnym etapie rozwoju danej linii układu krwiotwórczego [19].

Ostra białaczka promielocytowa (acute promyelocytic leukemia – APL) jest rzadką postacią białaczki i stanowi prawie 10% wszystkich ostrych białaczek. Blokada w różnicowaniu komórek powoduje dużą kumulację niewłaściwie wykształconych promielocytów, które nie różnicują się do dojrzałych, nieproliferujących granulocytów w szpiku kostnym. Kliniczne cechy APL obejmują promielocyty szpiku kostnego o niewłaściwym obrazie morfologicznym oraz koagulopatię. Ponadto każdy przypadek APL cechuje translokacja chromosomalna t(15;17), która prowadzi do zlania się receptorów RAR α . W następstwie tego procesu komórka zaczyna wytwarzać proteiny X-RAR α lub RAR α -X. Te różne połączenia wspomagają powstawanie białaczek [22,39]. Dodatkowo chorzy z APL charakteryzują się zaburzoną równowagą hemostatyczną. Testy laboratoryjne wykazują postępującą aktywację syndromu rozsianego wykrzepiania śródnacyniowego. Osoczkowy układ krzepnięcia krwi może być aktywowany bezpośrednio przez prokoagulanty wytwarzane przez komórki APL, lub też pośrednio przez zwiększone wytwarzanie interleukiny 8 i czynnika martwicy nowotworów TNF- α [19].

Receptorowy mechanizm działania ATRA na komórki APL

Retinoidy mogą wpływać zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio na transkrypcję genów. Efekty bezpośrednie są następstwem wiązania receptorów ze związanym ligandem

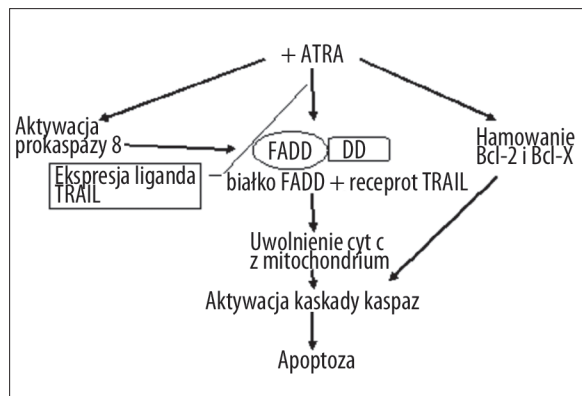
retinoidowym do fragmentu RARE w regionie promotorowym docelowych genów, których transkrypcja jest modulowana. Uważa się, że taki mechanizm pośredniczy w wielu procesach indukujących różnicowanie [39]. Natomiast pośrednie skutki działania retinoidów wynikają z obniżania aktywności transkrypcyjnej genów, których regiony promotorowe nie zawierają fragmentu RARE. Prawdopodobnie kompleks retinoid–receptor antagonizuje różne czynniki transkrypcyjne, poprzez rywalizację o powszechnie wymagane koaktywatory, co skutkuje tłumieniem ekspresji genów. Przyjmuje się, że antyproliferacyjne i przeciwwzpalne działanie retinoidów wynika z takiego właśnie negatywnego, pośredniego mechanizmu regulacji genów [3,39,54]. Kwas retinowy moduluje transkrypcję genów wpływając również na syntezę komponentów cytoszkieletu [20,29].

W terapeutycznym mechanizmie działania ATRA na komórki APL dużą rolę odgrywają receptory $RAR\alpha$, które modulują poziom ekspresji tkankowego aktywatora plazminogenu t-PA i trombomoduliny (receptor trombiny), podczas gdy wszystkie podtypy receptorów retinoidowych RXR (α , β , γ) są zaangażowane w inhibicję czynnika tkankowego [12].

Mechanizm działania ATRA niezależny od receptorów

W procesie apoptozy bardzo ważną rolę pełnią białka z rodziny Bcl-2; mogą one wykazywać aktywność pro- lub antyapoptyczną [30]. Decyzja o życiu albo śmierci komórki zależy od wzajemnych relacji ilościowych tych dwóch grup białek. W przypadku przewagi białek proapoptycznych dochodzi do obniżenia potencjału błonowego mitochondrium i zwiększenia przepuszczalności błon dla czynników proapoptycznych. Cytochrom c z prokaspazą 9 i czynnikiem Apaf 1 tworzy strukturę zwaną apoptosomem. Ten z kolei aktywuje kaspazy wykonawcze za pośrednictwem kaspazy inicjującej 9. Kaspazy odpowiedzialne są za śmierć komórki, która następuje w wyniku fragmentacji DNA, proteolizy białek cytoszkieletu, błon komórkowych, białek odpowiedzialnych za organizację przestrzenną DNA. Białka antyapoptyczne to Bcl-2 i Bcl-X. Nadekspresja białek Bcl-2 powoduje ograniczenie apoptozy w komórkach. Najlepiej poznany białkiem proapoptycznym jest białko Bax. Aktywacja tego białka nasila apoptozę [15,30,36]. Wiadomo, że po przyłączeniu ATRA dochodzi do zmian ekspresji białek Bcl-2 i aktywacji kaspaz. ATRA hamuje ekspresję białek Bcl-2 i Bcl-X oraz aktywuje kaspazy 6, 7, 8, 9, a ponadto uwalnia cytochrom c z mitochondriów [15,36,47].

W procesie apoptozy jest zaangażowany ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oraz jego receptory TRAILRs (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors). Jednocześnie ATRA aktywuje interferony, które współdziałają aktywując receptory TRAILs oraz kaspazę 8. Skutkiem jest zniszczenie mitochondriów oraz uwolnienie cytochromu c. Receptory TRAILs zawierają tzw. domeny śmierci DD (death domains), zdolne do aktywowania ścieżki apoptozy. Wiązanie TRAIL do TRAILRs, indukowane przez ATRA, prowadzi do przyłączenia białka FADD (fas-associated via death domain), które pełni rolę przekaźnika kaspazy 8. Pod wpływem aktywacji receptory TRAILs



Ryc. 4. Mechanizm działania ATRA niezależny od receptorów. W procesie apoptozy zaangażowany jest ligand TRAIL i jego receptory. Wiązanie liganda z receptorem, indukowane przez ATRA, prowadzi do połączenia białka FADD (białko będące przekaźnikiem prokaspazy 8) z domeną DD receptora TRAIL. Pod wpływem aktywacji tych receptorów następuje uwolnienie cytochromu c z mitochondrium. Jednocześnie ATRA zmienia ekspresję białek Bcl-2 i Bcl-X prowadząc komórkę na ścieżkę apoptozy

wiążą FADD. W efekcie następuje uwolnienie cytochromu c z mitochondriów. Cytochrom c w połączeniu z APAF1 (apoptotic protease activating factor 1) aktywuje kaspazę 9, która z kolei powoduje rozpad protein niezbędnych do przeżycia, co prowadzi komórkę do apoptozy. Apoptoza w wyniku działania TRAIL i TRAILs jest regulowana przez białko FLIP (FLICE – inhibitory protein), które są hamowane przez kaspazę 8 [14,16] (ryc. 4). Badania prowadzone na linii komórek nowotworowych NB4 ostrej białaczki promielocytowej wykazały, że ATRA nasila ekspresję prokaspazy 1, 7, 8 i 9, zwiększa aktywność tych białek oraz uwalnia cyt c z mitochondriów. Przemieszczenie cyt c powoduje zmniejszenie ekspresji genów antyapoptycznego białka Bcl-2, z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji białka proapoptycznego Bax. W następstwie tego procesu zmienia się stosunek ilościowy obu tych białek na rzecz proapoptycznego działania [36].

ATRA aktywuje także białko p53 nie wpływając na jego stabilność oraz wiązanie z DNA. Rola p53 polega na zapobieganiu przekazywaniu zaburzeń genetycznych komórkom potomnym poprzez wydłużenie fazy G1 cyklu komórkowego, co umożliwia naprawę uszkodzonych nici DNA [4,6]. Ten nowy mechanizm działania ATRA może mieć duże znaczenie w zahamowaniu cyklu komórkowego w fazie G1 wywołanym przez kwas retinowy [4].

Inne badania wykazują, że ATRA wpływa na czynniki wzrostu i protoonkogeny, które często ulegają ekspresji w komórkach neoplastycznych. Po ekspozycji na ATRA poziom ekspresji tych białek zmniejsza się [28].

Rola ATRA w modulacji ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w hemostazie

ATRA jest jedynym znanym czynnikiem przeciwnowotworowym, który oprócz wywołania remisji nowotworu, jednocześnie hamuje aktywność prokoagulacyjną krwi oraz wpływa na równowagę hemostatyczną, właściwości fibrynolityczne i antykoagulacyjne śródbłonna [10,27]. ATRA

może skutecznie modulować hemostatyczne właściwości komórek białaczki wpływając na ekspresję i aktywność prokoagulantów, aktywność fibrynolityczną, czy na poziom cytokin. Dodatkowo, ATRA wpływa na właściwości prawidłowych komórek śródbłonna naczyń modulując w pewnym stopniu działanie cytokin, a także bezpośrednio stymulując syntezę trombospondyny i t-PA [12].

Komórki białaczki APL wytwarzają co najmniej dwa prokoagulanty: czynnik tkankowy (TF) oraz prokoagulant nowotworowy (CP) [10]. TF jest to transbłonowa glikoproteina obecna zarówno w komórkach prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo. Będąc receptorem/efektorem czynnika VII osoczowego układu krzepnięcia krwi tworzy z nim kompleks aktywujący czynnik X, stymulując w ten sposób zewnątrzpochodny tor krzepnięcia krwi [12]. Prokoagulant nowotworowy jest wytwarzany jedynie przez tkanki płodu, błony płodowe oraz komórki nowotworowe, ma zatem cechy białka onkofetalnego [10]. CP aktywuje czynnik X bezpośrednio, bez udziału czynnika VII, nasila ponadto adhezję płytek krwi do kolagenu i fibrynowego [12]. Podawanie ATRA chorym na APL powoduje znaczący spadek aktywności prokoagulacyjnej [27]. W celu wykazania zależności działania ATRA od poziomu ekspresji TF i CP, przeprowadzono badania na dwóch liniach komórkowych białaczki promielocytowej NB4: wrażliwej na działanie ATRA (S-NB4 – ATRA sensitive) oraz linii odpornej na ATRA (R-NB4 – ATRA resistant), której komórki nie różnicowały się po ekspozycji na ATRA. Wykazano, że ATRA dodany do hodowli hamował ekspresję TF i CP w komórkach S-NB4. Natomiast w komórkach R-NB4 zaobserwowano znaczący spadek ekspresji TF oraz nieznaczny lub całkowity brak działania na CP. Wyniki te sugerują, że ekspresja CP jest związana jedynie z nowotworowym fenotypem, podczas gdy TF jest wytwarzany zarówno przez komórki niezróżnicowane, jak i zróżnicowane [10]. Wykazano ponadto, że ATRA powoduje wzrost poziomu tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), który jest odpowiedzialny za właściwości fibrynolityczne śródbłonna. Nadekspresja t-PA przy jednoczesnym obniżeniu stężenia PAI-1 (swoisty inhibitor dla t-PA) wzmacnia fibrynolityczne właściwości śródbłonna naczyń [11,27].

Terapeutyczne zastosowanie ATRA w APL

U większości chorych z APL następuje remisja nowotworu pod wpływem leczenia chemioterapeutykami w połączeniu

z ATRA. Stosowana dawka ATRA wynosi 45 mg/m²/dzień [5]. Odpowiedź na ATRA nie wynikała z cytotoksyczności tego związku, ale pobudzenia różnicowania promielocytów w neurofile, podczas którego następują zmiany w strukturze zarówno jądra jak i cytoplazmy [22]. Komórki podczas tego procesu nabywają cech charakterystycznych dla granulocytów, m.in. zdolność migracji i apoptozy [5,22,29]. Zastosowanie kwasu *trans*-retinowego w schemacie terapii APL powoduje remisję choroby, jednocześnie wpływając na zahamowanie syndromu wykrzepiania wewnątrzkomórkowego [19].

Zastosowanie terapeutyczne ATRA wiąże się z dwoma poważnymi problemami. U części pacjentów rozwija się tzw. syndrom kwasu retinowego, charakteryzujący się gorączką, zaburzeniami oddychania, tyciem, nadciśnieniem, czasami niewydolnością nerek. Ponadto, niekiedy podczas terapii rozwija się oporność na ATRA. Nieskuteczność terapii może być również spowodowana zwiększonym metabolizmem ATRA w wyniku zwiększonej aktywności enzymów cytochromu P450, bądź też zwiększonym poziomem komórkowym białek odpowiedzialnych za wiązanie ATRA [2,5].

PODSUMOWANIE

Kwas całkowicie *trans*-retinowy jest najbardziej aktywną, naturalną pochodną witaminy A. Odgrywa ważną rolę w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek prawidłowych oraz zmienionych nowotworowo. Zdolność ATRA do ingerowania w powyższe procesy jest wynikiem bezpośredniego lub pośredniego działania na ekspresję genów poprzez wiązanie z receptorami RARs. Obecnie prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie roli RARs i RXRs w rozwoju nowotworów oraz ich prewencji i terapii.

Apoptoza jest głównym sposobem eliminacji komórek nowotworowych. Wiadomo, że ATRA działając poprzez różne mechanizmy może zahamować proliferację, indukować różnicowanie oraz śmierć komórki w procesie apoptozy. Mimo wielu danych wciąż nie do końca znany jest mechanizm proapoptotycznego działania ATRA. W zależności od rodzaju nowotworu może on przebiegać w różny sposób. Wprowadzenie kwasu retinowego do leczenia ostrej białaczki promielocytowej indukuje różnicowanie komórek blastycznych do dojrzałych granulocytów i znacznie poprawia wyniki leczenia. Trwają badania nad zastosowaniem ATRA w leczeniu nowotworów litych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Altucci L., Gronemeyer H.: The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2001; 1: 181–193
- [2] Chun K.H., Lotan R.: Higher potency of the synthetic retinoid MX3350-1 compared to the natural all-trans retinoic acid in modulation of cell cycle and induction of apoptosis in head and neck squamous carcinoma cells. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 1830–1832
- [3] Clarke N., Germain P., Altucci L., Gronemeyer H.: Mode of action of RAR-RXR heterodimers. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2004; 6: 25–30. <http://www.expertreviews.org/> (25.05.2009)
- [4] Curtin J.C., Dragnev K.H., Sekula D., Christie A.J., Dmitrovsky E., Spinella M.J.: Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function. *Oncogene*, 2001; 20: 2559–2569
- [5] Degos L., Dombret H., Chomienne C., Daniel M.T., Mielcé J.M., Chastang C., Castaigne S., Fenaux P.: All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1995; 85: 2643–2653
- [6] Dworakowska D.: Rola białka p53, pRb, P21^{WAF1/CIP1}, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy. *Onkol. Pol.*, 2005; 8: 223–228
- [7] El-Metwally T.H., Hussein M.R., Abd-El-Ghaffar S.K., Abo-El-Naga M.M., Ulrich A.B., Pour P.M.: Retinoic acid can induce markers of endocrine transdifferentiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: preliminary observations from an *in vitro* cell line model. *J. Clin. Pathol.*, 2006; 59: 603–610
- [8] El-Metwally T.H., Hussein M.R., Pour P.M., Kuszynski C.A., Adrian T.E.: Natural retinoids inhibit proliferation and induce apoptosis in pancreatic cancer cells previously reported to be retinoid resistant. *Cancer Biol. Ther.*, 2005; 4: 474–483

- [9] El-Metwally T.H., Pour P.M.: The retinoid induced pancreatic cancer redifferentiation-apoptosis sequence and the mitochondria: a suggested obligatory sequence of events. *J. Pancreas*, 2007; 8: 268–278
- [10] Falanga A., Consonni R., Marchetti M., Locatelli G., Garattini E., Passerini C.G., Gordon S.G., Barbui T.: Cancer procoagulant and tissue factor are differentially modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 1998; 92: 143–151
- [11] Falanga A., Rickles F.R.: Management of thrombohemorrhagic syndromes (THS) in hematologic malignancies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2007; 165–171
- [12] Falanga A., Rickles F.R.: Pathogenesis and management of the bleeding diathesis in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2003; 16: 463–482
- [13] Falanga A., Toma S., Marchetti M., Palumbo R., Raffo P., Consonni R., Marziali S., Dastoli G., Barbui T.: Effect of all-trans-retinoic acid on the hypercoagulable state of patients with breast cancer. *Am. J. Hematol.*, 2002; 70: 9–15
- [14] Farooqui A.A., Antony P., Ong W.Y., Horrocks L.A., Freysz L.: Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2004; 45: 179–195
- [15] Gianni M., Ponzanelli I., Molteni L., Reichert U., Rambaldi A., Terao M., Garattini E.: Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ.*, 2000; 7: 447–460
- [16] Gottlieb R.A.: Programmed cell death. *Drug News Perspect.*, 2000; 13: 471–476
- [17] Guo J., Xiao B., Lou Y., Yan C., Zhan L., Wang D., Zhao W.: Antitumor effects of all-trans-retinoic acid on cultured human pancreatic cancer cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006; 21: 443–448
- [18] Guo J.M., Xiao B.X., Lou Y.R., Wang D.H., Yan C.H., Zhan L., Zhao W.H.: The effects of all-trans-retinoic acid on cell cycle and alkaline phosphatase activity in pancreatic cancer cells. *Med. Chem.*, 2006; 2: 457–461
- [19] Hellman A., Prejzner W.: Białaczki – rozpoznawanie i leczenie. *Przew. Lek.*, 2001; 4: 14–21
- [20] Izdebska M., Grzanka A., Ostrowski M.: Reorganizacja cytoszkieletu, a różnicowanie się komórek linii ludzkich białaczek HL-60 i K-562. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2006; 60: 64–70
- [21] Lee C.H., Wei L.N.: Characterization of the mouse nuclear orphan receptor TR2-11 gene promoter and its potential role in retinoic acid-induced P19 apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 127–136
- [22] Leszczyniecka M., Roberts T., Dent P., Grant S., Fisher P.B.: Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol. Ther.*, 2001; 90: 105–156
- [23] Li J., Orr B., White K., Belogortseva N., Niles R., Boskovic G., Nguyen H., Dykes A., Park M.: Chmp 1A is a mediator of the anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer*, 2009; 8: 7
- [24] Liu S., Wu Q., Chen Z.M., Su W.J.: The effect pathway of retinoic acid through regulation of retinoic acid receptor α in gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, 2001; 7: 662–666
- [25] Lotan R.: Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. *Anticancer Res.*, 1996; 16: 2415–2419
- [26] Lutz J.D., Dixit V., Yeung C.K., Dickmann L.J., Zelter A., Thatcher J.E., Nelson W.L., Isoherranen N.: Expression and functional characterization of cytochrome P450 26A1, a retinoic acid hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 77: 258–268
- [27] Marchetti M., Vignoli A., Bani M.R., Balducci D., Barbui T., Falanga A.: All-trans retinoic acid modulates microvascular endothelial cell hemostatic properties. *Haematologica*, 2003; 88: 895–905
- [28] Miller W.H.Jr., Moy D., Li A., Grippo J.F., Dmitrovsky E.: Retinoic acid induces down-regulation of several growth factors and proto-oncogenes in human embryonal cancer cell line. *Oncogene*, 1990; 5: 511–517
- [29] Olins A.L., Herrmann H., Lichter P., Olins D.E.: Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Exp. Cell Res.*, 2000; 254: 130–142
- [30] Opiela J., Kańska-Książkiewicz L.: Rola białek rodziny BCL-2 w kontroli apoptozy w pęcherzykach jajnikowych. *Biotechnologia*, 2006; 1: 90–96
- [31] Oridate N., Esumi N., Lotan R., Hing W.K., Rochette-Egly C., Chambon P., Lotan R.: Implication of retinoic acid receptor γ in squamous differentiation and response to retinoic acid in head and neck SqCC/Y1 squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 1996; 12: 2019–2028
- [32] Osanai M., Petkovich M.: Expression of the retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 limits programmed cell death. *Mol. Pharmacol.*, 2005; 67: 1808–1817
- [33] Park E.Y., Wilder E.T., Lane M.A.: Retinol inhibits the invasion of retinoic acid-resistant colon cancer cells *in vitro* and decreases matrix metalloproteinase mRNA, protein, and activity levels. *Nutr. Cancer*, 2007; 57: 66–77
- [34] Peng X., Yun D., Christov K.: Breast cancer progression in MCF10A series of cell lines is associated with alterations in retinoic acid and retinoid X receptors and with differential response to retinoids. *Int. J. Oncol.*, 2004; 25: 961–971
- [35] Recchia F., Sica G., Candeloro G., Necozone S., Bisegna R., Bratta M., Rea S.: Beta-interferon, retinoids and tamoxifen in metastatic breast cancer: long-term follow-up of phase II study. *Oncol. Rep.*, 2009; 21: 1011–1016
- [36] Simoni D., Tolomeo M.: Retinoids, apoptosis and cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 2001; 7: 1823–1837
- [37] Sklan D.: Vitamin A in human nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1987; 11: 39–55
- [38] Skrzycki M., Ścibior-Bentkowska D., Podsiad M., Czeczot H.: Poziomiany białek czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- κ B w wybranych nowotworach przewodu pokarmowego człowieka. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 25: 510–515
- [39] Soprano D.R., Qin P., Soprano K.J.: Retinoid acid receptors and cancers. *Annu. Rev. Nutr.*, 2004; 24: 201–221
- [40] Wang Q., Wieder R.: All-trans retinoic acid potentiates Taxotere-induced cell death mediated by Jun N-terminal kinase in breast cancer cells. *Oncogene*, 2004; 23: 426–433
- [41] Wang X.J., Hayes J.D., Henderson C.J., Wolf C.R.: Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19589–19594
- [42] Włazłak E., Surkont G., Kobos J., Tyliński W., Stetkiewicz T., Suzin J.: Ekspresja metaloproteinaz MMP-1, MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w przypadkach raka endometrium oraz rozrostów błony śluzowej jamy macicy. *Przeegl. Menopauzalny*, 2006; 6: 363–366
- [43] Wu Q., Chen Z., Su W.: Growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid through arresting cell cycle progression. *Chin. Med. J.*, 2001; 114: 958–961
- [44] Wu Q., Chen Z.M., Su W.J.: Anticancer effect of retinoic acid via AP-1 activity repression is mediated by retinoic acid receptor α and β in gastric cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002; 34: 1102–1114
- [45] Yang Q., Sakurai T., Kakudo K.: Retinoid, retinoic acid receptor β and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002; 76: 167–173
- [46] Ye X., Wu Q., Liu S., Lin X., Zhang B., Wu J., Cai J., Zhang M., Su W.: Distinct role and functional mode of TR3 and RAR α in mediating ATRA-induced signalling pathway in breast and gastric cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 98–113
- [47] Yu Z., Han J., Lin J., Xiao Y., Zhang X., Li Y.: Apoptosis induced by ATRA in MEPM cells is mediated through activation of caspase and RAR. *Toxicol. Sci.*, 2006; 89: 504–509
- [48] Zhang H., Rosdahl I.: Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int. J. Oncol.*, 2004; 25: 303–308
- [49] Zhang H., Satyamoorthy K., Herlyn M., Rosdahl I.: All-trans retinoic acid (atRA) differentially induces apoptosis in matched primary and metastatic melanoma cells – a speculation on damage effect of atRA via mitochondrial dysfunction and cell cycle redistribution. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 185–191
- [50] Zhang J.P., Chen X.Y., Li J.S.: Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823. *J. Dig. Dis.*, 2007; 8: 29–34
- [51] Zhang X.K., Liu Y., Lee M.O.: Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutat. Res.*, 1996; 350: 267–277
- [52] Zou C.P., Clifford J.L., Xu X.C., Sacks P.G., Chambon P., Hong W.K., Lotan R.: Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 1994; 54: 5479–5487
- [53] Zou C.P., Hong W.K., Lotan R.: Expression of retinoic acid receptor beta is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. *Differentiation*, 1999; 64: 123–132
- [54] Żaba R.: Bezpieczeństwo stosowania retinoidów. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2006; 23: 161–174

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.